

子宮頸部初期病変におけるヒトパピローマウイルス (HPV) 感染と免疫マーカー (講演要旨, <特集> 第58回シンポジウム3「子宮頸部初期病変の管理と治療-標準化をめざして」)

著者	笹川 寿之
雑誌名	日本産科婦人科学会雑誌
巻	58
号	11
ページ	1745-1751
発行年	2006-11-01
URL	http://hdl.handle.net/2297/7534

シンポジウム 3 子宮頸部初期病変の管理と治療—標準化をめざして

(2) 子宮頸部初期病変におけるヒトパピローマウイルス (HPV)

感染と免疫マーカー

金沢大学大学院・医学研究科・保健学専攻

助教授 笹 川 寿 之

Immunological Biomarkers for Human Papillomavirus Infection and Early Stage of Cervical Cancer

Toshiyuki SASAGAWA

Kanazawa University, Graduate School of Medical Science, Division of Health Sciences, Kanazawa

Key words : Cervical cancer · Human papillomavirus · Host-Immunoresponse

研究背景と目的

HPV 感染が子宮頸癌発症の原因であることが明らかになりつつある。女性の性に対する価値観の変化や社会構造の変化により、多くの女性の性に対して寛容な行動が一般化し、それに伴ってクラミジアなど女性の性感染症が増加する傾向がみられる。HPV の子宮頸部感染も 10～20 歳代の若者に蔓延していることも報告されつつある。いわゆる性感染症の尖圭コンジローマとは異なり、子宮頸部の HPV 感染はほとんどが無症候であり、肉眼で観察できるような病変を形成しない。したがって、これまで子宮頸部 HPV 感染は多くの産婦人科医に認識されずにきたのが実情である。HPV-DNA 検査の普及に伴い、子宮頸部細胞診や酢酸処理下のコルポスコピー検査によってのみ HPV 感染病変を検出できることが明らかになりつつある。本研究は、信頼性の高い HPV-DNA 検査法と免疫学的検査法を用いて、免疫学的観点から HPV 感染から子宮頸癌発生までの自然史を明らかにすること。そして、子宮頸部病変の進行を予測できるような免疫マーカーを見いだすことを目的とした。

結 果

1. 日本の子宮頸癌発生の実態と将来予測

子宮癌は 1990 年までは減少傾向にあったが、最近やや増加の傾向にあり、今後さらに増加すると予測されている。2005 年に発表された国立がんセンターの統

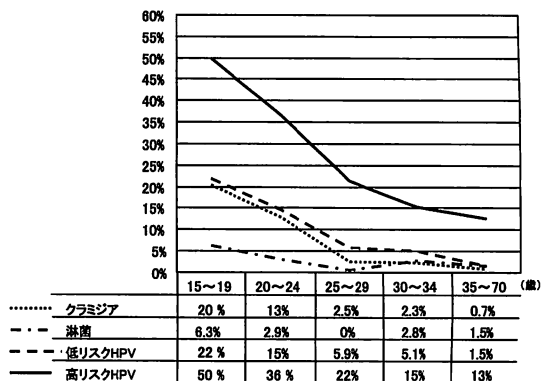


図 1 クリニックを受診した女性の子宮頸部 HPV 感染

計¹⁾では、子宮癌検診の普及によりこの 24 年間で子宮癌(頸癌、体癌を含む)は著しく減少したが、最近では 20～30 歳代の女性でむしろ増加する傾向にあり、子宮頸癌発症の若年齢化がみられる。我々は 2000 年から 2002 年まで北陸地方の 5 つの病院(3 公立、2 個人病院)の産婦人科を受診した女性から子宮頸部擦過細胞を採取し、hybrid capture 法による淋菌、クラミジア、低リスク型 HPV、高リスク型 HPV について検査した(図 1)²⁾。その結果、女性の STD で現在最も多いとされているクラミジアは、10 歳代の 20%、20 歳代前半の 12% に陽性であったが、低リスク型 HPV 感染は 10

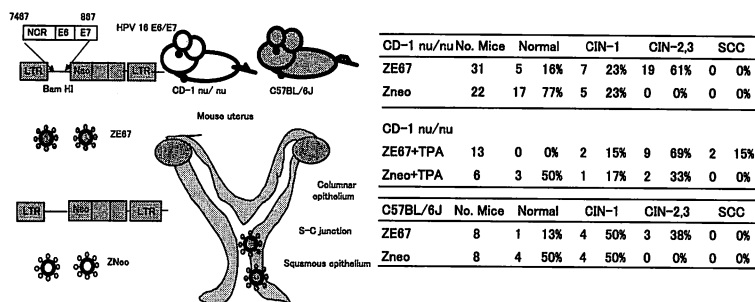


図2 HPV16 E6/E7 キメラレトロウイルスを用いたマウス発癌実験

歳代の22%, 20歳代前半の15%に陽性でクラミジアより高頻度であった。さらに子宮頸癌を誘発する高リスク型 HPV 感染は10歳代の56%, 20歳代前半の37%に陽性であり, 全体では高リスク型 HPV 感染はクラミジアの4倍多い感染症であることが判明した。このように日本において特に若い女性の子宮頸部 HPV 感染が蔓延しており, このことが子宮頸癌発症の若年齢化に関連している可能性が示唆される。

2. 高リスク型 HPV 感染と子宮頸癌の発生

HPV16 型 E6-E7 遺伝子を発現させるキメラレトロウイルス (ZE67) を作製し, マウスの子宮頸部・腔に感染させる実験を行った (図2)³⁾。感染から2年以内にヌードマウスの61%に CIN-2, -3 病変が形成され, ZE67 に腫瘍プロモーターである TPA を同時処理することで15%に癌が発生した。さらに免疫が正常である C57BL マウスにも同様の実験を行い, CIN2 以上の高度病変が38%に発生した。以上の結果から, T細胞が欠損したヌードマウスでは, HPV16 型 E6-E7 遺伝子の局所発現により比較的容易に子宮頸部・腔癌が発生しうることが明らかとなった。

ヒトの子宮頸部や腔に感染する HPV 型は現在, 47 タイプ報告されている。臨床的にはどのタイプが癌を誘発するのかを知ることは重要である。そこで我々は癌遺伝子領域である E6-E7 領域を増幅できる LCR-E7PCR 法を開発した⁴⁾。理論上 36 タイプの粘膜型 HPV を検出できる方法である。この方法を用いて, 北陸地方で発生した子宮頸癌や CIN 中の HPV-DNA を検出した結果⁵⁾, 子宮頸癌の93%, CIN-2, -3 の91%に HPV 感染を検出した。ところが, 癌を含む多くの症例で混合型 HPV 感染を認めた。本来, 癌はモノクロールであるはずであるため, 当然, 感染 HPV も単独型で

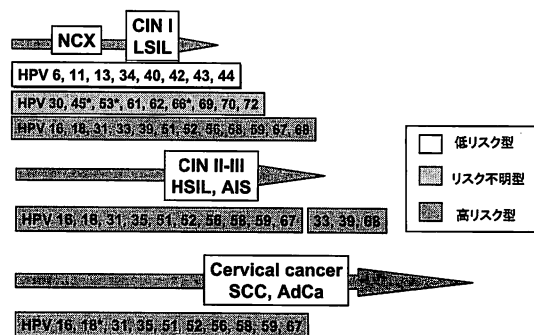


図3 子宮頸部細胞や組織で同定された HPV 型

あるはずである。そこで, 子宮頸癌組織で単独型感染しているタイプを高リスク型 HPV であると仮定したところ, 単独型として子宮頸癌からは HPV16, 18, 31, 45, 51, 52, 58, 67 を検出し, CIN-2, -3 から HPV33, 35, 56 型を同定した。さらに最近では, 初期癌から 35, 56, 59, CIN2 から 39, 68 型を同定しており, これら 14 タイプが高リスク型 HPV と考えている (図3)。

3. HPV-DNA 検査の子宮頸癌検診への応用

ある病院を受診した1,089人の細胞診について, 2人の検査士と1人の指導医が検鏡して診断したところ, 経験の浅い検査士では, CIN2 以上の異常の検出感度は66%であり, ベテラン検査士では72%であった (図4)。すなわち, ベテラン検査士であっても日母分類に従って診断した場合には CIN-2 以上の異常病変を28%見逃がす可能性があることを意味する。一方, LCR-E7 PCR 法による CIN-2 以上の異常検出感度 (図4) は100%, 市販の hybrid capture (HCA-2) 法でも91%であり, HPV-DNA 検査は, 細胞診よりも明ら

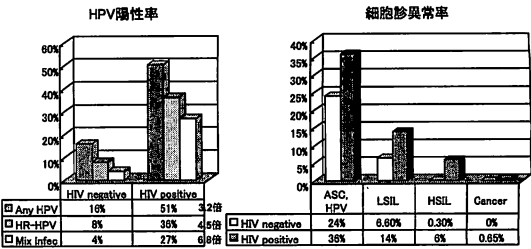
細胞検査士1 総数1,089名		CIN-1 以上の異常	CIN-2,3 以上の異常
検出感度	46%	66%	
検出特異度	98%	95%	

細胞検査士2 総数557		CIN-1 以上の異常	CIN-2,3 以上の異常
検出感度	69%	72%	
検出特異度	98%	99%	

LCR-E7 PCR法 (すべてのHPV型)		CIN-1 以上の異常	CIN-2,3 以上の異常
検出感度	67%	100%	
検出特異度	81%	73%	

HCA-2 法 高リスク型HPV		CIN-1 以上の異常	CIN-2,3 以上の異常
検出感度	80%	91%	
検出特異度	98%	86%	

図4 子宮頸癌検診の精度：細胞診とHPV検査



ナイロビのヘルスセンターを受診した17～61歳の女性468人を調査、HIV陽性者32%

図6 HIV感染とHPV感染および子宮頸部異常

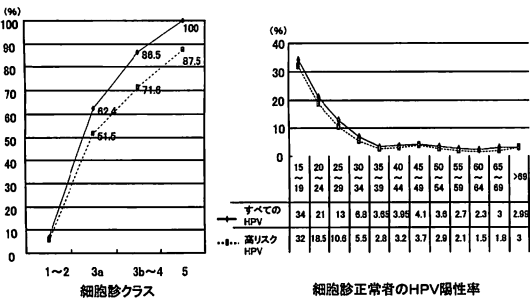


図5 子宮頸癌検診におけるHPV-DNA検査(石川県調査)

かに高感度であった。しかしながら、HPV-DNA検査の特異度は低く、LCR-E7 PCRの特異度は73%、HCA-2は86%であり、細胞診特異度89～95%より低い結果であった。HPV-DNA検査を子宮頸癌検診に応用した場合に偽陽性例が増加する可能性がある。次に、北陸地方の女性7,999人についてHCA-2法によるHPV-DNA診断と細胞診を同時に行った(図5)。細胞診でクラスが上がるほどHPV陽性率は増加し、クラス3bまたはクラス4の86.5%、クラス5の全例でHPVが陽性であった。次に、HPV陽性で細胞診正常の症例(仮の偽陽性例)についてその頻度を比べたところ、10～20歳代での偽陽性率は確かに高いが、30歳以上の女性のそれは6.8%以下であることが判明した。以上の結果から、高リスク型HPV-DNA検査は細胞診より高感度であること、30歳以上の女性の子宮頸部スクリーニングにおいて感度、特異度とも高く信頼性が高い検査法と考えられた。

4. HPVに対する免疫と子宮頸部病変

欧米での女子大生の疫学研究から、女性の多くは初めての性交経験後速やかにHPVに感染し、5年間の

期間中約7割近くが感染したと報じられている⁶⁾。また、そのようなHPV初期感染の約9割は自然に排除され治癒するが、残りの1割は持続感染化し、その中から子宮頸癌が発生するとされている⁷⁾。この自然治癒過程には、HPVに対する免疫応答が関与している可能性がある。2004～2006年にかけて、我々は、ケニアのKEMRI研究所と共同でHIV感染と子宮頸癌についての疫学調査を行った(図6)。その結果、HIV感染女性の51%がHPVに感染しており、HIV陽性者は陰性者に比べ、高リスクHPV感染は4.5倍、混合型HPV感染は6.8倍多いことが明らかとなり、また細胞診結果がLSILである頻度は2倍、HSILは20倍多かった。この結果から、HIV感染によるCD4陽性細胞、主としてhelper T(Th)細胞の減少によって免疫力が低下すると、HPV感染を許容し、癌化を促進する可能性があることが示された。しかし、実際の臨床現場では免疫が正常の女性においても子宮頸癌が発生しているため、HPV感染した人の中にはHPVに感染後にHPVに対する特異的な免疫応答が誘導されない、あるいは、誘導されても有効に作用しない場合があると推察される。

5. HPVに対する免疫応答と癌化

まず、我々はHPV16、18、31、45型のウイルス様粒子(VLP)⁸⁾を抗原にしたELISA法⁹⁾により患者血清¹⁰⁾や頸管粘液中¹¹⁾のウイルス抗体価を調べたところ、約7割の患者でHPV特異的なIgA、IgG抗体が認められ、この抗体の誘導は感染の持続化に関連することが判明した(図7)。しかし、HPVに感染した人のうち約3割には抗体が誘導されないことも明らかとなった。持続感染群と自然治癒群を比較したところ、HPV抗体誘導に有意差はみられなかったため、特異

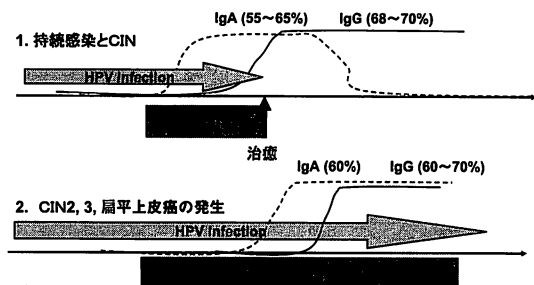


図7 HPV16, 18, 31, 45-VLP に対する頸管粘液中抗体

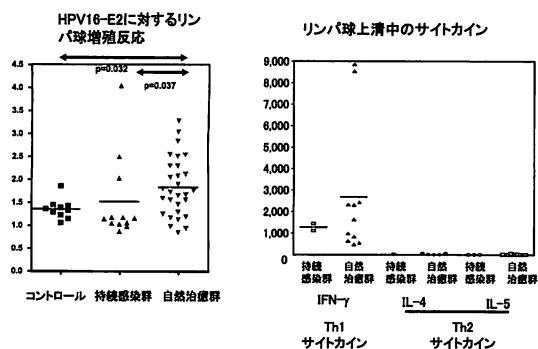


図8 HPV16型E2蛋白に対するヘルパーT細胞活性

抗体は予後を推定するマーカーには使えないと考えられた。

ウイルスの排除には細胞性免疫がより重要であることが知られている。HPV に対する細胞性免疫について検討するため、HPV16 型の E2 蛋白に対するリンパ球増殖反応について持続感染群、自然治癒群、正常群で比較したところ¹²⁾、自然治癒群では持続感染群に比べ E2 に対するリンパ球増殖反応 (Helper T: Th 活性) が明らかに亢進しており、そのリンパ球の培養上清中に Th-1 サイトカインである INF- γ が多量に分泌されていた (図 8)¹³⁾。この結果から、HPV 特異的な Th1 活性の亢進とそれに関連して起こる細胞性免疫によって HPV が排除されたと考えられた。

免疫応答において、抗体産生に作用する helper T type2 (Th2) リンパ球と細胞性免疫を活性化する helper T type1 (Th1) リンパ球の活性化には拮抗関係 (polarization: 分極化) が存在することが知られ、ある種の感染症では、どちらか一方が優位となったために発症する。その際、Th1, Th2 それぞれが活性化さ

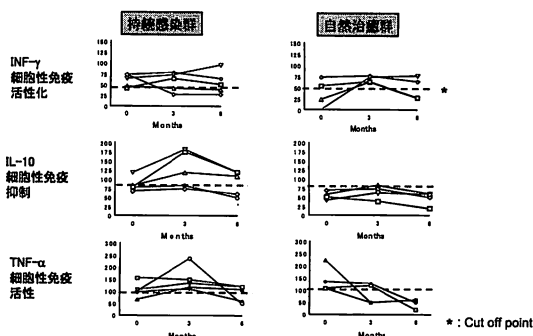


図9 自然治癒群と持続感染群の cytokine 分泌パターン

れると、それぞれに特異的なサイトカインが分泌される。そこで、子宮頸部粘液中の 4 種類のサイトカインの量を測定して局所免疫の活性化状態を検討したところ¹³⁾、CIN-1 の段階で IL-10 が、CIN-2, -3 では TNF- α の分泌亢進がみられた。IL-10 は Th-2 サイトカインであり細胞性免疫を抑制する。患者を追跡調査したところ (図 9)¹⁴⁾、持続感染群では IL-10 の分泌がみられたが、自然治癒群では全く分泌されていなかった。また、免疫組織学的検討では、IL-10 は、主として癌や CIN の間質に浸潤する単核球に発現していた。したがって、間質から分泌される IL-10 による細胞性免疫抑制作用によって持続感染が許容された可能性がある。一方、Th-1 活性を有する炎症性サイトカインである TNF- α は、調査開始時点ではすべての症例に分泌されていたが、自然治癒群でのみ治癒後に消失した。このことは TNF- α の分泌は細胞性免疫によるウイルス排除に連動して分泌されたと考えられる。興味深いことには、免疫組織染色において、TNF- α は CIN や癌の周囲にある間質部の単核球に主に発現していたが、多くは、炎症によって構造が破壊されている CIN 上皮や癌巣部位で強く発現する傾向にあった。この所見は、TNF- α が HPV 感染上皮細胞の排除に関連して分泌されたという仮説をさらに支持する。

サイトカイン分泌における Th1-Th2 活性化について検討したところ、HPV 感染から CIN-1 までの病変ではお互いのサイトカイン量に逆相関関係がみられた (図 10)¹¹⁾。この結果は、各個人において Th1/Th2 の分極化が起っており、免疫の方向性が定まっていることを意味する。興味深いことには、CIN-2 以上の病変では Th1, Th2 両サイトカインともに分泌が亢進し

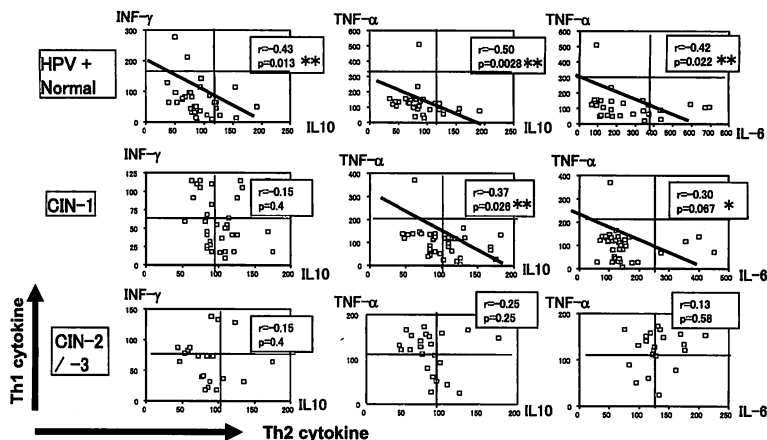


図 10 Th-1, Th-2 分極化と子宮頸部病変

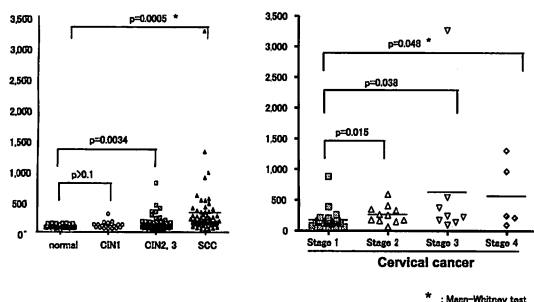


図 11 子宮頸部の悪性度と血清中 IP-10 量

ており、Th1-Th2 の分極化がみられない症例が増加した。HPV 感染初期には免疫は正しく機能して多くの女性では自然に HPV が排除されるが、CIN-2 以上の病変では何らかの原因で Th1/Th2 分極化が破綻し、その結果、異常細胞が排除されにくい環境となる、あるいは、免疫応答に応答となった細胞に対する生体の過剰反応である可能性などが考えられる。

6. 血清中のケモカインと子宮頸癌

サイトカインは局所で作用し、血清中に大量に分泌されることは少ない。したがって、子宮頸部病変の臨床マーカーとしては不適当である。一方、ケモカインは感染などの局所で発現し、リンパ液や血流にのって運ばれ、局所に免疫担当細胞を遊走させる物質であり、比較的血清中にも多く分泌されると考えられ、これに注目した。ケモカインにも細胞性免疫を活性化するリンパ球を遊走化させる Th1 ケモカインと、Th2 リン

ンパ球を遊走化させる Th2 ケモカインが存在する。我々は癌患者血清中の Th-1 活性化ケモカインである IP-10 と Th-2 ケモカインの TARC について調査したところ、IP-10 のみが浸潤癌患者で有意に増加していた(図 11)。しかも、癌の進行とともに分泌量が増加した。すなわち、癌が進行すればするほど細胞性免疫を活性化するケモカインが分泌されることを意味する。組織の免疫染色では、IP-10 はほとんど癌組織では染まらず、癌周囲の間質のごく一部の単核細胞にのみ発現していた。さらに手術で摘出した骨盤リンパ節について検討したところ、癌が浸潤するリンパ節近傍に存在するリンパ節内の単核球に強く発現していた。癌細胞の攻撃に対する生体反応、すなわち、Danger signal のようなものではないかと考えている。今後さらに検討が必要であるが、IP-10 が子宮頸癌の予後マーカーとして有用である可能性がある。

結論(図 12)

子宮頸部の高リスク型 HPV 感染によって子宮頸癌が誘導されるが、多くの HPV 感染は免疫学に排除される。HIV 感染者では、免疫調節の司令塔である Helper T(Th)細胞が壊されるため、免疫力は著しく損なわれる。したがって、HIV 感染者では HPV 感染しやすく、悪性変化しやすいと考えられる。HPV に対する L1 粒子抗体は、HPV の持続感染後に誘導されるが感染者の 3 割には誘導されない。このことは、HPV に感染しても、HPV に対する免疫が誘導されない個体が存在することを意味する。このような個体は、おそらく持続感染が成立しやすく、癌へ進行しやすいと

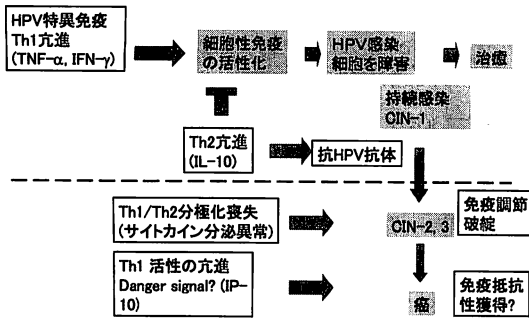


図12 子宮頸部発癌と免疫マーカー

考えられる。一方、HPV16型E2に対するリンパ球増殖反応の結果から、HPVに対する細胞性免疫の活性化(Th1活性)はHPV感染の排除に重要であることが判明した。また実際の患者の子宮頸部の免疫反応は多様であり、個々の症例でTh1またはTh2が優位の状態、すなわちTh1/Th2の分極化が起こっている。短期間の追跡において、IL-10が長期に分泌されている個体(Th2優位)は持続感染群に多く、IL-10による細胞性免疫の抑制が感染持続に関与していると考えられる。また、Th1活性のあるTNF-αは追跡を開始した時点では、ほとんどの症例で分泌されていたが自然治癒に関連して消退した。以上の結果から、Th1優位の免疫はHPVを排除し、Th2優位の免疫は持続感染を許容すると考えられる。しかし、このようなTh1/Th2分極化もCIN-2以上の病変では消失する傾向がみられた。子宮頸部病変の進行に伴って、免疫調節機構の破綻が示唆される。この結果は、CIN-2以上の病変を治療すべきとする考え方に理論的根拠を与えるかもしれない。免疫学的な観点からHPV感染と子宮頸部病変との関係を捉えることは発癌過程を理解するために重要であり、さまざまな免疫学的なマーカーを用いて、将来、発癌の予測や予後推定が可能となる可能性があると考えられる。

文 献

1. 国立ガンセンター統計. 2005
2. 安田英代, 笹川寿之, 中野 隆, 他. 北陸地方の若い女性の子宮頸部における性感染症(ヒトパピローマウイルス・クラミジア・淋菌)の危険因子

の解析. 日本性感染症学会誌 2003;14:60—68

3. Sasagawa T, Inoue M, Inoue H, et al. Induction of uterine cervical neoplasia in mice by human papillomavirus type 16 E6-E7 genes. *Cancer Res.* 1992;52:4420—4426
4. Sasagawa T, Minemoto Y, Basha W, H. et al. A new PCR-based assay amplifies the E6-E7 genes of most mucosal human papillomaviruses (HPV). *Virus Res* 2000;67:127—139
5. Sasagawa T, Basha W, Yamazaki H, et al. High-risk and multiple HPV infection associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2001;10:45—52
6. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, et al. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 2003;157:218—226
7. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, et al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* 2004 Nov 6-12;364:1642—1644
8. Sasagawa T, Pushko P, Steers G, et al. Synthesis and assembly of virus-like particles type 6 and 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology* 1995;206:126—135
9. Sasagawa T, Inoue M, Crawford L. Serological Responses to human papillomavirus types 6 and 16 virus-like particles. *Clinic Diag Lab Immunology* 1996;3:403—410
10. Sasagawa T, Dong YZ, Inoue M, et al. Immunoglobulins A and G responses against virus-like particles(VLP) of human papillomavirus type 16 in women with cervical cancer and cervical intraepithelial lesions. *Int J Cancer* 1998;75:529—535
11. Sasagawa T, Rose RC, Azar KK, et al. Mucosal immunoglobulin-A and -G responses to oncogenic human papilloma virus capsids. *Int J Cancer* 2003;104:328—335
12. Dillon S, Sasagawa T, Crawford A, et al. Resolution of cervical dysplasia is associated with T cell proliferative responses to human papillomavirus type 16 E2. (in submission)
13. Azar KK, Tani M, Yasuda H, A. et al. Increased secretion patterns of interleukin-10(IL-10) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) in cervical squamous intraepithelial lesions *Human Pathol* 2004;35:1376—1384

Abstract

Human papillomavirus (HPV) infection is the most important causative factor for cervical cancer. Our studies aimed to clarify the natural history of HPV infection for cervical cancer from an aspect of host immunity against HPV.

We have recently conducted an epidemiological study of HIV and cervical cancer in women visited to a health center in Nairobi, Kenya, and 31% of participants were HIV positive. HIV-positive women had 4.5 fold more high-risk HPV infection, and 6.8 fold more multiple HPV type infection than in HIV-negative women. Cytological examination revealed that high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) was 20 fold more in HIV-positive women than in HIV-negative women. Immune suppression by HIV appears to allow HPV infection and to promote malignant progression of HPV-infected cervical cells. When we examined the levels of serum or cervical-secreted HPV L1 antibody, elicited HPV L1 antibody was HPV type specific, and induced in women who had persistent HPV infection. However, presence of the antibody was not correlated with present status of HPV infection.

The lymphocyte proliferative response against HPV16 E2 was observed only in the women who cleared HPV16, while neither in the control women nor women who had persistent disease. Furthermore, the lymphocytes of the women who cleared HPV infection produced high amount of Th-1 cytokine IFN- γ , in vitro suggesting that cell mediate immunity is likely to eliminate HPV. Polarized helper T type 1 (Th-1) and type 2 (Th-2) responses were observed in women who are infected with HPV. However, the polarization was seen in women having HPV-infected normal cervixes and CIN-1, whereas such response was not observed in women having higher grade CIN (CIN-2/CIN-3). Simultaneous activation of Th1 and Th2 response appears to be elicited in malignant lesions, although the mechanism is unknown. Such aberrant immune status may reduce immune responses against HPV, or may represent enhanced immune responses against malignant cells which acquired resistance to HPV-specific immunity.

Serum cytokine levels may not represent local immune status, since many cytokines are limited to be released into the blood. Then we investigated serum levels of chemokines, which attract lymphocytes from lymph nodes to inflamed areas. Serum level of Th1 inducible chemokine, IP-10 was higher in cervical cancer than in normal and CIN. IP-10 was more released according to increasing clinical stage of cervical cancer. IP-10 appears to be released at danger, and it might be a good marker for predicting malignant condition.
